

(1) 日本国特許庁 (JP)	(12) 公表特許公報 (A)	(11) 特許出願公表番号 特表2001-509612 (P2001-509612A)
(43) 公表日 平成13年7月24日(2001.7.24)		
差別記号	F 1 ナゴード(多) ナゴード(多)	
(51) InCl'	G 0 2 B 2/06 C 1 2 M 1/00 C 1 2 Q 1/68 C 0 1 N 2/64	C 0 2 B 2/06 C 1 2 M 1/00 C 1 2 Q 1/68 G 0 1 N 2/64
審査請求状 案状 案 現行請求項 有 (余48頁) 最終頁に近く	F	E

(71) 出願人 リブレヒトーカールスヴァニザエルジー
トハイデルベルク
ハイデルベルク ゼミ
ドイツ連邦共和国 ハイデルベルク ゼミ
ナーレシュトラーーゼ 2

(72) 免明書 ミヒャエル ハウスマン
ドイツ連邦共和国 ルートヴィッヒスハーフェン バウルーレーベーシュトラーゼ 4

(31) 優先権主張番号 1 9 7 2 9 5 1 2 6
平成11年1月21日(1993.1.21)

(32) 優先日 平成9年7月0日(1997.7.10)

(33) 優先権主張国 ドイツ (DE)

(81) 指定国 EA (AM, AZ, BY, KG,
KZ, MD, RU, TJ, TM), AU, CA, JP,
US

(74) 代理人 井型士 欠野 敏雄 (外4名)

最終頁に近く

[特許請求の範囲]

[請求項1] 照明ないし感知システムと、対象空間と、検知システムとを有し、

前記照明ないし感知システムは、照明頭と、第1の対物レンズと、第2の対物レンズまたは反射器とを有し、

第1の対物レンズと、第2の対物レンズまたは反射器とは、これらが一次元の定在ウェーブフィールドを形成するのに適するように相互に配置されており、

前記対象空間は、対象物に対する保持および操作装置を有し、

前記検知システムは、対物レンズ、接眼レンズおよび検知器を有する形式の、ウェーブフィールド頭部鏡において、

前記照明ないし感知システムは、2つまたは3つすべての空間方向に、コヒーレントな光ビームに対する少なくとも1つのリアル照明显示またはバーチャル照明显示と、部分ビームを干涉結合するための少なくとも1つの反射器またはビームスプリッタ、またはコヒーレントな光ビームに対する別の照明显示と有し、

前記部分ビームにはそれぞれ1つの対物レンズが配置されており、かつ当該部分ビームは光波シーケンスを形成するのに適したものであり、

照明显示の1つの光波シーケンスは、反射器ないし他の照明显示の光波シーケンスに対して逆並列に、または可変可能な角度で配向されており、

当該面には、前記照明显示の1つから発する光波シーケンスが、反射器ないし他の照明显示により、平坦な表面を有する定在ウェーブフィールドに干涉されるようになされており、

検知対物レンズは、エビデンス検知に適した、および/またはラスターの光紡は干涉干渉した少なくとも1つの検知対物レンズを有し、

該検知対物レンズの開口数は有利にして垂直に配置されており、エーブフィールドの1つの波面において垂直に配置され、当該対物レンズと同じであつてよく、

当該検知対物レンズは隔離システムの対物レンズと同様に相互に配置され、すなわち、1つの二次元または3次元定在ウェーブフィールドを対象空間に形成するのに適する。

本発明の校正方法は、このウェーブフィールド頭部鏡、およびウェーブフィールド頭部鏡を有し、これらの頭部鏡は、それぞれ頭部鏡および隔離システムを有し、このシステムは少なくとも1つ以上のリアル照明显示およびビーム頭部鏡と、少なくとも1つの対物レンズ(タイプ1の場合)、ないしは2つの対物レンズ(タイプ1の場合)を有する。ここにおいて照明显示および対物レンズは次のように相互に配置される。すなわち、1つの二次元または3次元定在ウェーブフィールドを対象空間に形成するのに適する。本発明の校正方法は、このウェーブフィールド頭部鏡に適合しており、藍色赤色マーキングされた対象物体間の幾何学的距離を測定することができる。この距離は有效距離分布の主観尺度の半価幅よりも小さくない。本発明はさらに、ウェーブフィールド頭部鏡DNA印字決定のための方法に関する。

たは少なくとも1つの固定の検知スリットが配置されており、かつ点検知器、とりわけフォトマルチブライヤ、フォトダイオード、またはダイオードアレイが後置されている。

ことを特徴とするウェーブフィールド頭微鏡。

【請求項2】 少なくとも1つの空間方向で、開口数の大きさは対物レンズに開口数の小さな対物レンズまたは反射器が配置されており、
別の1つまたは2つの空間方向で、開口数の小さい2つの対物レンズ、または開口数の小さい対物レンズと反対側とが直立に配置されている、請求項1記載のウェーブフィールド頭微鏡。

【請求項3】 照明ないし励起システムと、対象空間と、検知システムとを有するウェーブフィールド頭微鏡であって、
前述照明ないし励起システムは、照明版と対物レンズとを有し、当該照明版と対物レンズとは直立に、定在ウェーブフィールドを形成するのに適するように配置されており、

前述対象空間は、対象物に対する保持および操作装置を有し、
前述検知システムは、対物レンズ、接眼レンズおよび検知器を有する形式のウェーブフィールド頭微鏡において、
前述照明ないし励起システムは、3つの空間方向の少なくとも1つに、コヒーレントな光ビームにかける少なくとも1つのリアル照明显またはバーチャル照明显と、少なくとも1つの部分ビームを出力結合するための少なくとも1つのビームスプリッタを有し、

前述照明显とビームスプリッタには共通の1つの対物レンズが配置されており
該対物レンズに、照明版およびまたははバーチャル照明显ないしは光波シーケンスが入り結合可能であり、
これら光波シーケンスは、後方(対象空間の反対側)焦点面に直立に配置された2つの焦点を有し、かつ2つの焦点面の間に空間で可変調整可能な角度で相互に延長し、1つの一次元定位ウェーブフィールドに干渉し、
前述検知システムは、エビズ光検知に適した、および/またはラスク状の点検

判に適した少なくとも1つの検知物レンズを有し、

該檢知物レンズの開口数は有利には大きく、かつ当該檢知物レンズは前述システムの対物レンズと同じでもよく、

エビズ光検知した検知物レンズには平坦な(二次元)検知器、例えばカメラが前置されしており、

ラスター状の点検列に適した検知物レンズには少なくとも1つの固定共焦点検知リング設りおよび/または検知ホール放り、および/または少なくとも1つ固定検知リストが前置されており、点検知器、とりわけフォトマルチブライヤ、フォトダイオードまたはダイオードアレイが後置されており、
ことを特徴とするウェーブフィールド頭微鏡。

【請求項4】 照明ないし励起システムは、同じまたは別の1つまたは2つの空間方向に、コヒーレントな光ビームに対するそれ少なくとも1つの別のリアル照明显またはバーチャル照明显、および/または少なくとも1つの部分ビームを出力結合するための少なくとも1つのビームスプリッタを有し、
当該部分ビームには、それぞれ1つの別の対物レンズが配置されており、
当該対物レンズによって光ビーム(光波シーケンス)が対象空間に偏向され、
次のように偏向されている、すなはちこれら光ビームが同じ、または別の1つまたは2つの空間方向から発した光ビーム、ないしはこれにより形成された一次元または二次元のウェーブフィールドにより、1つの二次元ないし3次元ウェーブフィールドに干涉されるよう配向されている、請求項3記載のウェーブフィールド頭微鏡。

【請求項5】 対象空間は対象物ホルダを有し、
該対象物ホルダには、測定構造体および/または集合により校正ターゲットを有する対象物が1つまたは2つの相互に直交して延長する軸を中心に向板可能にウェーブフィールド内で支撑され、
少なくとも1つの輪に対しても36°(2π)の回転性が有利である、請求項1から4までのいずれか1項目載のウェーブフィールド頭微鏡。

【請求項6】 多次元ウェーブフィールドを形成する照明显、および/または反射器、および/またはビームスプリッタ、および/または対物レンズ、およ

び3次元ウェーブフィールドは、1つまたは2つの相互に直交して並立する側を中心的に回転可能である、請求項1から5までのいずれか1項記載のウェーブフィールド装置。

【請求項7】 検知システムには光センサーが設けられており、該センサミラーは、側方反射鏡を所定の反射率の有利に最大蛍光強度で結合するのに適するように配置されている、請求項1から6までのいずれか1項記載のウェーブフィールド装置。

【請求項8】 照明システムは、3つの空間方向の少なくとも1つに、2ま

たはマルチ蛍光励起のためのリアル照明显在を有し、さらに別に1つまたは2つの空間方向に2つまたはマルチ蛍光励起のためのリアルおよび/またはバーチャル照明源を有し、

当該照明部は、これにより形成された相互に異なる波長 ($\lambda_1, \lambda_2, \dots, \lambda_i$) の定在ウェーブフィールド (WF₁, WF₂, ..., WF_i) と、それぞれ $d_1 = \lambda_1 / 2n \cos 0^\circ$ ないし $d_2 = \lambda_2 / 2n \cos 0^\circ$ ないし $d_i = \lambda_i / 2n \cos 0^\circ$ である最大波ないし最小波間の間隔 (d_1, d_2, \dots, d_i) を有し (ただし、n = 对象空間における屈折率、 $0, 0.2, \dots, 0.1$ = 波長が $\lambda_1, \lambda_2, \dots, \lambda_i$ である光波シ

ーケンスと光軸との交差角)、
ウェーブフィールドWF₁, WF₂, WF_iは相互に、2つまたはすべての定在

波の少なくとも1点が同じ箇所 (すなわちマルチフォントン励起の箇所) に発生するよう配向されている、請求項1から7までのいずれか1項記載のウェーブフィールド装置。

【請求項9】 照明源、対象物レンズ、および一次元電気ウェーブフィールドを形成するのに適した導電性ミラーの配置構成が、対象物支持体ホルダに対して相対的に設けられており、対象物に付属する測定構造体および/または校正ターゲットが世界の周囲によって頭部検出過程の前、または測定中に整列可能である、請求項1から8までのいずれか1項記載のウェーブフィールド装置。

【請求項10】 請求項1から9までのいずれか1項記載のウェーブフィールド装置を適用して、DNA断片決定するためのウエーブフィールド装置において、同じ蛍光色素により、所定の大きさおよび空間的構成の校正ターゲットをマー

分析すべきDNAシーケンスのすべての組合せアブシーケンスを、すべての組合せアブシーケンスが分析すべきシーケンスと同じヌクレオチドで開始するよう作成し、

分析すべき成分を、すべての3'エンドにおいて基準蛍光色系マーカaにより、5'エンドおよび/または所定の中間箇所において蛍光色系b, g, cまたはiにより、それぞれヌクレオチド、ベースがアデニン(マークb)、グアニン(マークg)、シトシン(マークc)またはチミン(マークi)をキャリーしていなるかに応じてマーキングし、

ここで蛍光色素マーカ、a, b, c, iおよび/または異なるスペクトル群名を有し、それぞれ1つまたは複数の蛍光色素分子を含んでおり、
マーキングされたDNAアブシーケンスをキャリアに固定し、これらが紙面のシーケンスとして存在し、多次元ウェーブフィールド装置にもたらされるようにして、

線形DNAハサブシーケンスを定位波面に対して、aと、aないし、cまたはtとの間の正確な間隔測定 (精度 $\pm 1 * 10^{-10}$ m) が強度重心の検出と相対性の校正後に実行可能であるように配向し、

蛍光マーカの信号をステップごとにスペクトル分離して相互に記録し、
蛍光マーカの間隔とスペクトル群名とから、分析すべきDNA部分のDNAベースシーケンスを検出する、

ことを特徴とするDNAへ条件決定するためのウェーブフィールド頭部説法。
【請求項11】 該当する対象物を対象物ホルダ、とりわけ対象物支持プレート、対象物支持ファイバ、対象物支持ホルダ、または対象物支持体に準備する前、準備中、または準備後に、潔掃すべきない位置決めすべき対象物支持体 (同じ測定構造体) を異なるまたは同じスペクトル群名の蛍光色素によりマーキングし、

ここで少なくとも、その位置の間隔が有効点像分離数の最大値の半値幅よりも小さい、このように位置決めすべき測定構造体をスペクトル群名の異なる蛍光色素によってマーキングし、
同じ蛍光色素により、所定の大きさおよび空間的構成の校正ターゲットをマー

(7)

ヤングし、

蛍光発光する校正ターゲットを、対象物と共にないし測定構造体と共に、または別個に対象物ホルダに準備し、
測定構造体および校正ターゲットを、一枚条件の下で同時にまたは順次調査的
に撮影し、
スベクトル名の異なるそれぞれ2つの所定の校正ターゲットを、それぞれの
光学系の波長に依存する絶対または位相決め特性を考慮して測定し、
ここで換算された測定値（すなわち光強度）を既知の光強度（すなわち
基準）と比較し、

実際値と目標値との差から補正值（すなわち校正值）を検出し、
当該校正值により、光学系に起因するズレを、種々の放射焦点、とりわけ測定
構造体の前方の際に補正する校正ノリ法において、
蛍光色素マーキングされた測定構造体および／または蛍光色素マークリングされ
た校正ターゲットを有する生物学的対象物をシケンシャルにまたは同時に、固
々の（例の）2つまたは3つの空間方向で交叉して相互に延びする定位の、1
つの三次元または三軸元ウェーブファイアードに垂直に干涉するウェーブファイア
ル井戸により照射し、ここで蛍光色素が蛍光放射のために刷り起し、
蛍光強度を検知するために、カメラおよび／または1つまたは複数の二次元攝
成像を使用し、
当該三次元構成体は、それぞれ円形、リング、またはスリット状の取りを有す
る側面検知器からなるか、または複数の円形、リング、またはスリット状の取り
からなる構成体であり、

測定構造体および／または校正ターゲットを有する対象物、または一次元ない
し三次元ウェーブファイアード、または両方を測定過程にステップごとに1つま
たは2つの直交して延びる軸を中心回転し、
ここで蛍光色素マーキングされた測定構造体および／または校正ターゲットを
、シケンシャルにまたは同時に、1つまたは2つの個別に位置するウェ
ーブファイアードにより照射する、
ことを特徴とする校正方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

本発明は、照明ないし励起システムと、対象空間と、検知システムとを有する
ウェーブファイアード測定装置に関する。ここで前記照明ないし励起装置は、少なく
とも1つのリアル照明源およびチャル照明源と、少なくとも1つの対物レン
ズを有し、照明源および対物レンズは、一次元のウェーブファイアードを形成する
のに適するように配置されている。前記対象空間は、対象物に対するホルダと操
作装置を有する。また前記検知システムは、対物レンズ、接眼レンズ、および檢
知器を有する。本発明はさらに、蛍光色素マーキングされた対象物構造体間の幾
何学的開闊度測定のための校正方法に関する。ここで対象物構造体間の開闊度は、有
効点像分布関数の主最大値の半価幅よりも小さくともよい。さらに本発明は、ウ
エーブファイアード測定によるDNA順序決定のための方法に関する。

【0002】

従来の技術
通常異的マーカ、例えばDNAヘテロ型またはプロテインゾンデを使用することに
より、生物学的（微細）対象物、とりわけ細胞、細胞膜、細胞器等または染色体
(以下、単に対象物と称する) ほとんど任意に小さな(サブ)構造体をマーキ
ングすることができる。このような數 μm (10^{-4} m) から數 10 nm (10^{-9} m) の次元にあらう構造体を特異的に表示することができ。マーカは通常は蛍光
色素またはコロイト状微粒(金)粒子と結合しており、その光学的検知および若
干容易にし、これを初めて可能にする。

【0003】

同じ対象物内で2つのマーカを直互に別個に検知するために、該当するマーカ
はしばしば色の異なる蛍光色素と結合される。通常使用される蛍光色素の色灰付
スペクトルは、深い青から緑、赤を越え、赤外線スペクトル領域にまでわたる。
しかし刷起スペクトルでも蛍光スペクトルでも区別できず、その蛍光放射寿命が
区別のためのパラメータとして利用される蛍光色素が使用されることもある。こ
のことの利点は、波長に依存する焦点シフトが発生しないことである。蛍光色素
はまだ種々異なる反射スペクトルを有することもあり、使って異なるスペクトル

岩名を有することもある。しかしこれは同じ光エネルギーで、例えばマルチオーバンプロセッサにより励起できる。この場合も波長に依存する焦点シフトを、スペクトル窓が異なる蛍光色素間での励起で回避することができる。

【0004】

このような、生物学的微細対象において特異的な（サブ）構造体と結合可能なたまには結合した蛍光色素を以下、蛍光素マーカと称する。

【0005】

2つの蛍光素マーカの励起スペクトルおよび/または放射スペクトルおよび/または蛍光寿命が一致すれば、この蛍光色素マーカは該当するパラメータの点で同じスペクトル名を有している。測定に前述する1つまたは複数のパラメータにおいて蛍光素マーカが異なれば、これらは異なるスペクトル名を有する。

【0006】

蛍光とは以下、同じ物質の励起スペクトルと放射スペクトルとの間で損傷が発生し、この損傷が顕微鏡または懸念によるものではあり得ない、いすれかの光子交作用であると理解された。これはとりわけ多光子交作用を含み、この交作用では励起波長よりも長くなることがある。

【0007】

さらにここで概念「蛍光」は、これに密接に結びついた発光現象、とりわけ螢光に対して使用される。これは比較的小い平均強光寿命、例えば數m sから數10 m sの頃までの蛍光の螢光寿命を含む。以下、密に結びついた発光、螢光、および螢光の過程を本発明では同じように取り扱う。

【0008】

並置された生物学的対象物、および定義された対象点／対象構造体に関する統的位置決め（距離および角度測定）での蛍光色素マーカの検知と結果は、光学顕微鏡的測定方法によって実行される。ここではいわゆる“点像分布関数”（point spread function; PSF）、または使用される顕微鏡または光学系一様の“点応答”、すなわち理想点形状の対象物から同じように理想的な点形状の画像を形成する能力が重要である。点像分布関数は若狭光学系の特性を表し、結像光学系の

品質に対する尺度である。

【0009】

対象構造体間の間隔測定は、有効点像分布関数に実質的に依存する。有効とは、マークされた対象点の局所位置により与えられるという意味である。この有効点像分布関数もまた、それぞれの局所的解析率および対象物での吸収、すなわち対象物の組込み媒体、液浸液体、およびガラスでの吸収に大きく依存する。

【0010】

有効点像分布関数は一般的に、使用される顕微鏡に対して計算された点面像分布関数とは大きく異なる。技術的に最適化された周辺条件の下で測定された点分布関数も通常、実際的にルーチン実験条件の下で生物学的対象物で造成された有効点像分布関数とは異なる。

【0011】

なぜなら有効点像分布関数は多くの場合得られるものではなく、間隔測定の校正是計算された理论結果に基づくか、または標準条件の下で実行された校正測定に基づいて行われるからである。これは例えば反射法である。しかし2つの方法は、生物学的対象物における3次元間隔測定の際には精度に問題がある。その結果、対象構造体間の空間的間隔の検出が甚だしく不確実になり、生物学的対象物の場合はこのような不確実性の量的推定は数μmまで含まれる。

【0012】

最近まで当該専門分野では、全員一致の信念があった。すなわち、2つの対象構造体は、これらが有効点像分布関数の主成分の少なくとも半個既だけお互いに離れている場合にだけ分離することができると言うものである。

【0013】

1996年に初めて、本筋の発明者は、遠隔野球装置（および蛍光分析）に対する校正方法を提案した。これによれば、その2つの間隔が該当する遠隔野球装置の分解能よりも小さい、すなわち有効点像分布関数の主成分の半個既よりも小さい対象構造体間の間隔を定め、該当する対象構造体の3次元空間における位置に依存しないで精度で実行可能である。

【0014】

この方法は次のステップを有する：

- ・該当する対象物の対象物ホルダ、とりわけ対象物支持ブレート、対象物支持フレームまたは対象物支持流体での遮断前、測定中または測定後に、探査すべきまたは位置決めすべき対象物（測定対象物）を、異なるおよび／または同じスペクトル署名の蛍光色系によりマークし、すなわち、相互にごく近所にあり、その各別点画像分布間数の半周大値の半価幅にある、位置決めべき構造体（測定構造体）をスペクトル署名の異なる蛍光色系によりマークし、その相互間隔が有効点像分布間数の主最大値の半価幅よりも大きい測定構造体をスペクトル署名の異なるまたは同じ蛍光色系によりマークする。位置決めすべき2つの測定構造体は、これらが例によればその位置または別の基準により一義的に識別できる場合には常に同じスペクトル署名によりマークしなければならない。

【0015】

- ・同じ蛍光色系により、所定の大きさおよび空間的配置構成の校正ターゲットを同じ蛍光色系によりマークする。

【0016】

- ・蛍光発光する校正ターゲットを対象物と共にまたは別個に、対象物ホルダ（対象物支持ブレート、対象物支持フレーム、対象物支持流体等）に搭載する。

【0017】

- ・（被検）対象物および校正ターゲットを一致条件の下で同時にまたは順次、蛍光度または蛍光分析法で検出する。

【0018】

- ・スペクトル署名の異なるそれぞれが定められた2つの校正ターゲットを、それぞれの光学系（顕微鏡または液体蛍光計）の波長に依存する結像特性またはローラリセーション特性を考慮して測定し、ここで検出された測定值、すなわち実際直を既知の実験的間隔値、すなわち日標準（アナログ撮影用形状に基づいて計算された標準値、ナノアーチュメトリの差、ナノアーチュメトリ校正値）と比較し、実際値と目標値との差、すなわち校正値が、とりわけ測定対象物の種々の放射箇所の最初における光学系に施された強

を補正するために使用される。

【0019】

長い目見れば：（相間の間隔に応じて）異なるまたは同じスペクトル署名によりマークされた対象（サブ）構造体（以下、測定構造体と称する）間の間隔測定が、相応のスペクトル署名と既知の大きさおよび空間的配置構成を備えた独立

の（校正）ターゲット間の高精度の位置決めに基づき、それぞれの光学系の波長に依存する結像特性およびローラリセーション特性を考慮して実行される。ここで（校正）ターゲット間の校正測定と生物学的対象物の測定とは同じシステム条件および周辺条件の下で行われる。この校正ターゲットは、測定すべき（対象）構造体と同じまたはそれより高いマルチスペクトル性を有する。校正ターゲットは生物学的対象物に直接配置することができる。また別個のフレーバートとして対象物ホルダ（対象物支持フレート、または対象物支持ファイバ／毛細管、または対象物支持流体等）に存在するか、または対象物ホルダの一部とすることができる。

【0020】

無傷の三次元生物学的対象物における2つまたは3つの測定構造体であって、その間隔および広がりが有効点像分布間数の主最大値の半価幅よりも小さいものも、そのスペクトル署名（蛍光吸収波長および／または蛍光放射波長および／または蛍光放射寿命）の異なることにに基づいて分別することができ、その相互間隔を検出することができる。

【0021】

間隔測定は個々の測定構造体の位置決めに還元され、光学的遮隔野領域または蛍光分析計でも、点像分布間数の主最大値の半価幅よりも格段に高い精度により実行することができる。該当する測定構造体の重心の位置決めは、その蛍光信号の最大強度によって達成される。すなわち、蛍光点（＝蛍光測定構造体）の測定された（回折に削除された）信号（强度補殺）から、主最大値と副最大値からの全体積を考慮して、信号の重心が検出され、ひいては測定構造体の位置が検出される。光学系にエラーがなく、その結果、測定された強度分布（＝強度曲線の経過）が理想的に対称であれば、強度曲線の重心は位置決め精度内で、測定された強

度分布の主成分（＝回折像の0次極大値）と位置的に一致する。この新たな較正方法によって、光学的遮隔性顕微鏡並びに例えばウェーブフィールド測定装置を用い（または走査光分析計を用いても）、生物学的液体対象物の幾何光学的間隔を測定することができる。ここでは検出すべき間隔は、対象物における有効点像強度分布関数の土居人哉の半価幅よりも大きい。これにより実行された間隔測定の構成内容は、分作能が向上された際に得られた間隔測定に相当し、以下）省略して“等価分解能”について述べることができる。

【0022】

マルチスペクトル校正によって、システムの信頼性についての in situ 測定を具体的な生物学的対象物で実行することができる。蛍光寿命を一般的にバラメータ形式として使用する場合、および／または蛍光色蒸を同じ光子エネルギーにより観察する場合には、対象物面における干涉的“*in situ*”補正は較正によって省略される。高分解能の遮隔性顕微鏡、例えばウェーブフィールド測定装置に対して、適切な蛍光色蒸マーカを使用すれば、この較正方法により 3 次元幾何形状の間隔測定を生物学的対象物において分子レベルの精度（すなわち 10 nm 以下）の等価分解能で実行することができる。

【0023】

補正値／較正値を比較および検出するための公開第 511B を基準とするために有利には次の方法ステップが実行される。

【0024】

N 個の測定構造体の重心から右端点偏分市閏数の主成分の半価幅よりも大きな間隔を有する 1 つまたは複数の校正ターゲット B を任意のスペクトル器名によりマークする。

【0025】

N 個の測定構造体のスペクトル的に分離された回折フィギュアの直心の間隔 d_{ik} (i, k = 1 .. N, i ≠ k) と、較正ターゲット B に対する N 個の測定構造体の間隔 d_{ii} を測定し、両像分析の自動方法を適用する。

【0026】

測定構造体に対して区間 d_{ii} と d_{ik} をもつとも細い点像分布閏数の平面で測定

し、並びに他のすべての間隔を測定する。このために対象物を軸ノットモザイク イックにそれぞれ所定の角度 φだけ回転する。

【0027】

較正測定からの光学的収益を補正し、補正され測定された間隔 d_{ik} (φ_{ik}) と d_{ii} (φ_{ii}) に対してそれそれ適切な位相シフトを伴うコサイン閏数 Δ_{ik} cos(φ_{ik} + φ_{ii}) ないしは A_{ik} cos(φ_{ik} + φ_{ii}) を適合する。

【0028】

d_{ii} ないしは d_{ik} の適合閏数の最大閏数 A_{ik} と A_{ii} を並大係數により割り算し、N 個の測定構造体相互間のユーリッド間隔 D_{ik} ないしは D_{ii}、または基準点 B に対する測定構造体の間隔を検出する。

【0029】

最大値の検出に対しては有利にはけ加的に、これに相当する間隔 z_{ik} の最小値を d_{ik}、d_{ii} の平面に対して直交する平面で検出しして同様に評価する。

【0030】

N 個の測定構造体のすべての座標の検出および基準点 B に対するその相対的位置、すなわち位置 x_i、y_i、z_i および x_k、y_k、z_k の位置、ないしは開角 x_k - x_i、y_k - y_i、z_k - z_i および x_k - x_i、y_k - y_i、z_k - z_i の検出は本発明により、照度線で測定された 3D の間隔 D_{ik} 乃至 D_{ii} を基準として、有利には次の等式を使用して行う。

【0031】

$$\begin{aligned} D'_{ik} &= (x_k - x_i)^2 + (y_k - y_i)^2 + (z_k - z_i)^2 \\ D'_{ii} &= (x_i - x_k)^2 + (y_i - y_k)^2 + (z_i - z_k)^2 \\ D'_{ik} &= (x_i - x_k)^2 + (y_i - y_k)^2 + (z_i - z_k)^2 \end{aligned}$$

検出された測定結果が確実に於けるため、前に説明した方法ステップを複数の較正ターゲット B に対してと、同じ N 個の測定構造体に対して実行すべきである。

【0032】

N 個の測定構造体の座標および開角は重心に基づいて検出することができ、この重心はすべての基準点に対する測定構造体に対して実行される。

【0033】

とりわけグラフィック表示に 대해서は、提出された位置 x₁、y₁、z₁および x₂、y₂、z₂を有利には点像分布関数により読み込む。この点像分布関数はそれを選択された評価分解能により評価する。この点像分布関数はそれによって得た評価分解能による評価器を有している。

【0034】

測定構造体および校正ターゲットを蛍光色系マーキングするため、有利には蛍光外線、可視光線および／または赤外線光波長領域で励起でき、紫外線、可視光線および／または赤外線光波長領域で検出することのできる蛍光色系を使用する。

【0035】

校正ターゲットとして生物学的校正ターゲットまたは非生物学的ないし合成校正ターゲットを使用することができる。

【0036】

生物学的校正ターゲットは、相互に既知の間隔を有する生物学的対象物のマークシングされた前版により実行することができる。該当する形状のマークシングは例えば通常の生物学的ソリューションにより実行することができる。このような生物学的校正ターゲットを使用することの、合成校正ターゲット、例えば校正小球を使用することに対する実質的利点は、校正の際に対象物の光学的周辺条件の他に付加的に寄生的周辺条件が校正に影響を与えることである。これは例えば、実際の螢光信号と非特異的背景との比である(自動的画像分析アルゴリズムによって検出される)。

【0037】

非生物学的校正ターゲットないし合成校正ターゲットとして特に微細小球が適する。この微細小球は、位置決めすべき測定構造体と同じか、またはこれより高いマルチスケール等化を行する。この微細小球は生物学的対象物と同じように取り扱われる。このドライな校正ターゲットは有利には対象物ホールダに所定の空間的位置構成で固定される。この固定は、該当する対象物ホールダを作製する際にすでに用いることができる。このことはルーチン利用に対して特に有利である。

【0038】

点像分布関数の主な大域の場、いわば分解能限界は、空間における相対位置に依存して、例えば光軸に対して垂直(＝側方)には、光軸の方向(＝軸方向)に点像分布関数を定める。直交する2つのレーザビームの代わりに、ウェー

おけるよりも細いという公知のすべての通常評価鏡鏡法において存在する問題を除去するために、前述の校正方法を技術技術で公知のいかわる微細鏡トモグラフ法と非常に良好に組み合わせることができ。この微細鏡トモグラフ法では、(生物学的) 対象物が毛細管またはグラスファイバに配置され、装置絶縁下で所定のように軸、通常は鏡鏡の光軸に対して垂直な軸を中心回転される。このときに偏振測定が、有効点像分布開数のまつとも長い半直線を有する方向で実行される。

【0039】

通常評価鏡鏡法は、生物学的対象物における非常に小さい、螢光色系マークによって識別されるサブ構造体を检测および検出するのに特に適する。なぜなら、公知のエビデンス評価鏡鏡法または共焦点レーザ走査顕微鏡に対して、軸方向にも、すなわち波面に対して平面にも高い分辨率を有しており、格段に良好な分解が可能だからである(その代表は開口数が高い場合には、頭部に使用する光の波長よりも格段に小さくすることができる)。これがウェーブフィールド評価鏡法である。

【0040】

ウェーブフィールド評価鏡では、米国特許第4,621,911号に記載されているように、螢光または発光プレーラートが光学的頭微鏡で定位したウェーブフィールドにより照明される(定位波フィールド螢光頭微鏡法、 SWFM)。定位するウェーブフィールドは、光がコヒーレントに位置される箇所に(だけ)発生する。プレーラートは定位波の平坦波面シートに配置され、並光螢光または爆光発光のために配置される。波面とその相との間隔は(とりわけ頭微鏡のために)変化することができる。例々の光の印筋断面から、コンピュータ画像処理によって、螢光螢光または爆光螢光する対象物点の3次元分布を再現することができる。

【0041】

平坦な波面は検知された対象物の光軸に対して垂直に配置されており、2つのレーザビームを頭微鏡系の光軸に対して所定の角度 0°でコヒーレントに重畠するこにより形成される。ここで角度 0°は、並光と屈折光が定位している場合には波面相位の間隔を定める。直交する2つのレーザビームの代わりに、ウェー

ンフィールドをかのようにして形成することができる。すなわち、レーザビームを井元の角度で適切に反射した（例えばミラーによる）後、それ自身を干渉させるのである。平坦な鏡面は他のことを特徴とする。すなわち、強度強調が鏡面上に対して垂直の方向に（コ）サイン形状である。

【0042】

黄光発光ないしは光発光は均一の光学的フィルタによりスベントラル別され、種々異なるヒーメン階に案内される。または尖端点検知される。達成可能な解像度、すなわち同じスペクトル署名の蛍光色線によりマークされた2つの点状対象構造体間の最小検知可能間隔は、アッペル基準（＝第1の点対象物の回折画像の0次屈光は第2の点対象物の回折画像の1次屈光の中に位置決めされる）により、またたび有効点像分布距離の最大値により与えられる。これはそれぞれの波長、使用される対物レンズの開口数、並びに対象物、埋め込み媒体、場合により使用されるカバーガラスおよび場合により使用される波段流域の局所的屈折率に依存する。

【0043】

公知のウェーブフィールド顕微鏡は基本的に以下のよう構成される。この顕微鏡は次の要素を有する。

【0044】

(1) 照明系ないしは励起系、これらは少なくとも1つのリアル照明頭およびバーチャル照明源と、少なくとも1つの物レンズからなり、これらは1次元、正弦波状のウェーブフィールドを形成するのに用意に用意されている。

【0045】

(11) 対象物に対するホルダと操作装置を有する対象空間。

【0046】

(111) 撮影システム、検出システムは、少なくとも1つの対物レンズと、少なくとも1つの接眼レンズと、少なくとも1つの検知器とからなり、しばしばカメラ、とりわけCCDカメラであり、CCDチップが中間面に来るよう配置されている。

【0047】

この從来技術によるウェーブフィールド顕微鏡（以下、1次元ウェーブフィールド顕微鏡（SWFM）と称する）の欠点、ないしこれにより実現可能なウェーブフィールド顕微鏡法の欠点は、周期的に形成されるウェーブフィールド（光学的セクショニング法と関連したエビオ光学検知において）のために対象構造体が多い程度に記録ないし記憶され、その広がり波面に対して垂直方向に入／2nよりも格段に大きいことである（ $\lambda = \text{励起の波長}, n = \text{有効屈折率}$ ）。この多様性のため、干涉パターンにより造成される解像度改善の効率的利用がますます困難となる。

【0048】

間隔測定を実行し、3次元対象物の空間的関係をさらに保証するために、公知の遠隔野顕微鏡法は、一次元ウェーブフィールド顕微鏡法も含めて、袖モグラフ法と組み合わせることができる。このために保証すべき生物学的対象物、場合により較正ターゲットを装備した後、対象物ホルダないし対象物支持体としての毛細管またはグラスファイバに準備される。毛細管／ファイバは正確に定位され、たとえ異なる直角が可能である。この毛細管／ファイバを顕微鏡に設定するために特別のホールドが提案される。このホールドは剛性の、有利には持重部が扁平化されたフレームからなり、これに少なくとも1つの支承ブッシュが取り付けられている。このブッシュ内には毛細管またはグラスファイバをその長手軸を中心回転することができるよう支承することができる（有利には回転軸は顕微鏡の光軸に対して垂直）。（文部省は、毛細管／ファイバの回転軸が顕微鏡の光軸に対して垂直に近在するよう配置しなければならない。）毛細管／ファイバにおける被検対象物の回転は、毛細管／ファイバの回転により直接、または有利には回転モーターを使用して行う。

【0049】

本発明の課題は、公知の形式のウェーブフィールド顕微鏡をさらに改善し、平坦なウェーブフィールドを1次元以上で形成するのに、干涉最大の間隔の変異性、少なくとも1つの接眼レンズと、少なくとも1つの検知器とからなり、しばしばカメラ、とりわけCCDカメラであり、CCDチップが中間面に来るよう配置されるよう、このようないわゆるウェーブフィールド顕微鏡と組み合せて使用可能であるようされている。

に対する。さらにウェーブフィールド顕微鏡のDNA解析決定のための方法を提供するものである。

【0050】

この課題の解決手段は、一方では以降のいわゆる“多次元ウェーブフィールド顕微鏡”にあり、他方では同じように後に説明する多次元ウェーブフィールド顕微鏡の適用に適合した校正方法にある。さらに“蛍光DNA解析決定”的ための方法が提案される。

【0051】

本発明による“多次元ウェーブフィールド顕微鏡”(タイプ1)では、冒頭に述べた形式のウェーブフィールド顕微鏡が取り扱われる。この顕微鏡は以下にリストアップした特徴を有する。

【0052】

(1) 照明系ないし励起系が、2つまたは3つすべての空間方向に、コヒーレントな光ビームに対する少なくとも1つのリアル照明显源またはバーチャル照明显源を有し、少なくとも1つの反射器またはビームスプリッタを部分ビームを出力結合するために行し、さらにもコヒーレントな光ビームに対する別の照明显源を有する。

これらの光ビームにはそれぞれ少なくとも1つの対物レンズが配置されており、それぞれ光波シーケンスを形成するのに適するものである。ここで照明鏡の1つの光波シーケンスは逆並列または可変調節可能な角度で反射器ないし他の照明显源の光波シーケンスに対して配向されている。そして照明鏡の1つから発する光波シーケンスは反射器ないし他の照明显源の光波シーケンスにより、半径n波面を有する1つの在位的ウェーブフィールドに干涉される。

【0053】

(2) 検知システムは、エビデンス分析に適したおよび／またはラスター状の点検知に適した少なくとも1つの検知対物レンズを有する。この対物レンズは有利には開口数が大きく、その光軸はドットウェーブフィールドの波面に対して斜面に配置されており、励起系の対物レンズと同じであってもよい。エビデンス分析に適した検知対物レンズには扁平な(2次元) 検知器、例えはカメラが配置されており、ラスター状の点検知に適する検知対物レンズには少なくとも1つの固定の共焦点

ズリンク校りおよび／または検知ホール校りおよび／または少なくとも1つの固定の検知スリットが配置されており、点検知器、とりわけフォトマルチブライヤ、フォトダイオード、またはダイオードアレイが後置されている。

【0054】

開口数が大きいことは、ここでは開口数を1であり、開口数が小さいとは、開口数く1であると理解されたい。

【0055】

ウェーブフィールド顕微鏡(タイプ1)の特に有利な実施形態では、少なくとも1つの空間方向で、開口数の大きな対物レンズに開口数の小さな対物レンズまたは反射器が配置されており、別の1つまたは2つの空間方向で、開口数の小さい2つの対物レンズまたは開口数の小さい対物レンズと反射器が相互に配置されている。

【0056】

本発明の“多次元ウェーブフィールド顕微鏡”(タイプ1)では、冒頭に述べた形式のウェーブフィールド顕微鏡が取り扱われる。この顕微鏡は次の特徴を有する。

【0057】

(1) 照明系ないし励起系は、3つの空間方向の少なくとも1つに、コヒーレントな光ビームに対する少なくとも1つのリアル照明显源またはバーチャル照明显源を有し、少なくとも1つのビームスプリッタを少なくとも1つの部分ビームを出力結合するために有し、これら光ビームには共通の対物レンズが配置されており、この対物レンズに照明显源およびビームスプリッタの光ビームないし光波シーケンスを次のように入力結合することができます。すなはち、これら光ビームないし光波シーケンスが(対象空間の反射鏡)の後方焦点面上に、相互に距離をおいた2つの焦点ポイントを形成し、2つの焦点面の間で可変調節可能な角度で相互に延び、1次元の定在ウェーブフィールドに干涉するように入力結合することができる。

【0058】

(2) 検知システムは、エビデンス分析に適したおよび／またはラスター状の点検知

に通じた少なくとも 1 つの検知対象レンズを有し、この検知対象レンズは有利には開口部が大きく、励起系の対象レンズと同じであつてもよい。エビデンス検知部は複数の検知対象レンズには平出な 2 次元検知器、例えばカメラが前側されており、ラスタ状の点検知に適した検知対象レンズには少なくとも 1 つの固定の共焦点検知リンク板りおよび／または検知ホール板りおよび／または少なくとも 1 つの固定の検知スリットが前側されおり、点検加器、とりわけフォトマルチブライヤ、フォトダイオード、またはダイオードレイが後置されている。

【0059】

ウェーブファイールド顕微鏡（タイプ 11）の有利な実施例では、照明系ないし励起系は同じ空間方向、または別の 1 つまたは 2 つの空間方向に、コヒーレント光ビームに対するそれぞれ 1 つの別のアリル照明源またはハーチャル照明板を 1 つのビームスプリッタを行し、これらの部分ビームにそれぞれ 1 つの別の対物レンズが配置されおり、この対物レンズにより光ビーム（光波シーケンス）が対象空間に偏向され、次のように配向される。すなわちこれらが、同じ空間方向または別の 2 つの空間方向から発する光ビームにより、またはこれにより形成された 1 次元または 2 次元ウェーブファイールドにより、2 次元または 3 次元ウェーブファイールドに干渉されるように配向される。

【0060】

前記の本発明のウェーブファイールド顕微鏡全体（タイプ 1 と 11）で非常に有利な他の改修形態では、対象空間が対象物ホルダを有し、このホルダに測定構造体および／または場合により校正ターゲットを備えた対象物が 1 つまたは相互に直交して定位する 2 つの軸を中心ウェーブファイールド内で回転可能に支承され、少なくとも 1 つの軸に対しては 360°（2π）の回転性が有利である。

【0061】

この本発明の多次元ウェーブファイールド顕微鏡タイプ 1 とタイプ 11 により、時間的に並接して、および／または同時に複数の対象面を 1 つ、2 つおよび／または 3 つの対象レンズ（ないしはこれらに直交する軸）によって照射することができる。スペクトル署名が同じまたは異なり、即ちが有効気泡分布閾値の主成分

値の半価幅よりも小さい点状対象物の検査距離測定を（すべての）空間的方向で行うことができる。

【0062】

固定の共焦点検知リンク板り、検知ホール板り、および／または固定の検知スリットを少なくとも 1 つの適切な光強度検知器と組み合せれば、対象物を x、y、および z 方向でウェーブファイールドによりラスター化する有利な手段が作られる（対象物走査またはステージ走査）。

【0063】

本発明のウェーブファイールド顕微鏡タイプ 1 と、これにより実行可能なウェーブファイールド顕微鏡法は、とりわけ公知の一次元ウェーブファイールド顕微鏡に対して次のようないくつかの利点を有する。すなわち側方分解能（すなわち光軸に対して垂直）も側方分解能も格段に改善される。扁平な対象物を軸方向、共焦点システムを使用せずに初めて別することができるようにになった。さらに対象物を複数しないし記録／データ収集中にテラヘルツ間にシフトすることができる。画像処理方法および再現方法により、このようにして得られた多記録から比較的高い側方分解能が得られる。1 つの対物レンズを有する本発明の構造タイプ 1 はさらに一二次元ウェーブファイールドを、エビデンス顕微鏡の光軸に対して垂直に形成するのに適し、これによりその側方分解能を改善するのに適する。

【0064】

この“多次元ウェーブファイールド顕微鏡”（タイプ 1 および／またはタイプ 11）の別の有利な実施例では、多次元ウェーブファイールドを形成する照明显尾 y び／または反射器および／またはビームスプリッタおよび／または対物レンズ、および／または多次元ウェーブファイールドが、1 つまたは相互に直交して定位する 2 つの軸を中心回転可能に配置されなければならない。

【0065】

2 次元または 3 次元のウェーブファイールドに定位する対象物のラテラル対象領域を檢知リンク板り、検知ホール板りしないしは検知リストに絞像するために、それぞれ水免めのウェーブファイールド顕微鏡（タイプ 1 および／またはタイプ 11）に走査ミラーを装備することができる。この走査ミラーは該当するラテラル

対象領域を所望の、通常は最大の蛍光発光強度で粘像するように配置される。

00661

本発明の多点光エーブルフィールド強微鏡（タイプⅠおよびⅡまたはタイプⅢ）の特に有利な改善形態では、この強微鏡は2つまたはそれ以上の光子電光鏡起に適し、いわゆる“マルチフォント強光鏡起と組み合わせたウェーブファイルド強微鏡”を有する。この強微鏡ではそれぞれ照明系が3つの空間方向の少なくとも1つにリアル照明頭を2フォント配置またはマルチフォント配置のために、別の1つまたは2つの空間方向に1つのリアルおよびノーマルはバーチャル照明源を2つまたはマルチフォント配置のために有する。これにより形成された定在波（λ₁ウェーブファイールド（WF₁, WF₂, ..., WF_i）は相互に異なる波長（λ₁, λ₂, ..., λ₃）を有する。それぞれの最大波長ないしは最小波長との間の距離（d₁, d₂, ..., d₃）はd₁=λ₁/2n cos 0°, 1, ないし d₂=λ₂/2n cos 0°ないし d₃=λ₃/2n cos 0°である。これらは各空間における屈折率、n=対象空間と光路との交差位置、θ₁, θ₂, ..., θ_i=波長λ₁, λ₂, ..., λ_iの光路シーケンスと光路との交差位置である。これらのウェーブファイールドWF₁, WF₂, ..., WF_iは本発明では次のように相互に疎向される。すなわち、2つまたはすべての定在波の少なくとも1つの最大波長が同じ箇所で、すなわちマルチフォント配置の箇所に存在

2 フォトン顕微鏡またはマルチフォトン顕微鏡に対して透した照明原は近来の技術で公知であり、例えば刊行物 W. Denk, J. H. Strickler, J. W. Webb, "Two-Photon Laser Scanning Fluorescence Microscopy", *Science*, Vol. 248, pp. 73-76 (6 April 1990) に記載されている。この照明原は、種々異なる波長のフォトンまたは同じ波長のヒーレントなフォトンを発生する。

[0068]

1 フォトン励起および2フォトン励起またはマルチフォトン励起を用いて測定することの利点は、スペクトル零点の異なる蛍光色素マーカーを同時に励起することである。このことにより開拓測定のエラーを対象物の色収差に基づいて除去することができる。2フォトン励起の場合には、2つのフォトンが同時に分子を励起

するエネルギーを送出する場合には虫元がリカルドによると、これは、起に開発する2つのフォトンが同じ、または異なる波長ないしはエネルギーを持つ。異なる波長により(λ1, λ2)同時に発生する励起に対しては、いわゆる“2フォントウェーブフィールド調節鏡”的場合、それぞれの空間方向の各々にそれぞれ波長λ1とλ2の2つのウェーブフィールドを組み込まなければならぬ。2つの存在ウェーブフィールド(WF1, WF2)の最大強度は最小波はここで間隔d1 = λ1 / 2 cos θ1 ないし d2 = λ2 / 2 n cos θ2を有する(ここでn = 密度空間における屈折率、θ1, θ2 = 波長λ1, λ2のレーザービームと光軸との交差角)。一般的に間隔d1とd2は異なるから、2つのウェーブフィールドは空間方向ごとに成るように配向される。すなわち、2つの定位法の主最大値が同じ箇所に存在するように配向される。マルチフォント効果はこの点でだけ発生することができる。すなわち、2つのウェーブフィールドが異なる箇所でだけ発生することができる。これにより1つの空間方向のウェーブフィールドの個々の端だけがマルチフォント励起に使用される。次元がdより大きい対象物での多能性は、条件k1d1 = k2d2(k1, k2は整数)を満たすため初めて発生する。虫元マーケシングされた測定標査体および校正ターゲットが元で初めて発生する。虫元マーケシングされた測定標査体および校正ターゲットのマルチフォント励起によって、3次元対象の一貫性が達成される。

[0069]

2.フォントまたはマルチフォント抗電気遮断法を使用することによって、光遮断器、すなわち対象物、対象ライン、および対象面の所定位置が可能になり、これにより対象物が運動する場合でも改ざされた経路品質が達成される。

[0070]

本発明の多点式ケーブルフィールド開閉装置の周間に有効な改修形態では、光遮断器レンズ、および1次電気的ケーブルフィールドを形成するのに適した半導体ミラーからなる構成体が対象物支持ホルダに対して相対的に設けられ、対象物に存在する判定構造体(およびノッチ)または校正ターゲットを、必要な場合には(例えばこれらが分子鎖に存在する場合)電界の印加によって、微弱測定過程前半または中に整列させることができる。(このようにして空間的に整列された分子鎖は長い尺度で常に一定の位置に保たれることができる)本発明のケーブルフィールド開

100701

鏡のこの変形実施例は、とりわけウェーブフィールドがDNA断片決定の段階に適用されることは1次元遮光装置において有利にはCCDカメラが公知のように使用される。

【0071】

蛍光発光を検知するために有効にはCCDカメラが公知のように使用される。

カメラは検知リンク校りまたは検知ホール校りまたは検知リストの後方に配置することができる。CCDカメラなししCCDチップの代わりに、本発明の多次元ウェーブフィールド顕微鏡に電池的画像記録装置を装備することができる。これは、従来技術の共振点レーザ走査顕微鏡(CLSM)から公知である。本発明では基本的に、いすゞかの感光性検知システム、例えばフォトダイオード、フォトマルチブリッカ、CCDカメラ/チップ、CCDアレイ、アバランシュダイオード、(アバランシュ)ダイオードアレイ、2次元(アバランシュ)ダイオードマトリクスを検知リンク校りまたは検知ホール校りまたは検知リストの後方に配置することができる。これは蛍光を検知し、記録し、蛍光断片決定を行うことができるようにするためである。

【0072】

本発明の校正方法は、以下の特徴を有する、冒頭に述べた形式の校正方法である。

【0073】

(1) 蛍光色标记された測定構造体および/または蛍光色标记マーキングされた校正ターゲットを備えた生物学的対象物が選択的にまたは同時に、2つまたは3つの空間方向で相互に配置して存在する、2次元または3次元ウェーブフィールドに対して相互に干涉する対称的な個々の(別個の)ウェーブフィールドにより形成される。ここで蛍光色标记は蛍光発光のために励起される。

【0074】

(2) 蛍光強度を検知するためにカメラ、および/または個別検知器からなる1つまたは複数の2次元構成体が使用される。個別検知器は、それぞれ凹形、リンゴ形、リスト状の校り、または複数の円形、リンゴ形、リスト状の校りからなる構成体を行する。

【0075】

(3) 測定構造体および/または校正ターゲットを備えた対象物または1次元ないし2次元ウェーブフィールド、または両方を測定範囲中にステップごとに1つの軸または相互に直交する2つの軸を中心回転し、蛍光マーキングされた測定構造体および/または校正ターゲットを選択的にまたは同時に、相互に直交する1つまたは2つの個々のウェーブフィールドにより照明する。

【0076】

同時照明の場合、測定構造体および校正ターゲットを有する微細対象物が固定されるか、または軸を中心回転可能に支承される。2つまたは3つの相互に直交して存在する定在的で平行なウェーブフィールドが干涉され、微細対象物を同時に照明する。ウェーブフィールドが2つの場合には、2次元対称グリッドを備えた面が整然する。このグリッドは最大強度と最小強度の点からなる。3つのウェーブフィールドを使用する場合には、対称性で規則的に配置された、最大強度と最小強度の点からなる3次元空間グリッドが発生する。最大強度と最小強度との間には連続的強度分布が存在する。

【0077】

通常照明の場合には、微細対象物をウェーブフィールド中で2つの軸を中心回転する。検知中または検知後に、ウェーブフィールドの位置を対象物に対して相対的に変化することができる。

【0078】

通常照明の場合には、微細対象物を使用すれば本発明により、スペクトル番号が同じまたは異なる蛍光ターゲット間の3次元(3D)幾何学的間隔測定を分子レベルの精度で行うことができる。すなわち10nmよりも良好な3D空間分解能と、1nmよりも良好な3D位臵決め精度によって行うことができる。電子顕微鏡ないし光学的および非光学的直接距離測定とは異なり、探査すべき対象物の3次元構造は完全なままである。なぜなら、複数的ステップが各點されるからである。これにより3次元保持微細対象物において、3D間隔測定を有効点像分布関数の主成分大値の半価幅よりも小さい領域で行うことができる。とりわけこの方法により3次元間隔測定を、生物学的対象物の生体条件の下で実行することができる。DN A鎖対決定の際には、ゲルの作製とDNA片を電気泳動的に分離することが省略

される。同じようにオーデジオグラフも評価することができる。なぜなら反射性マーキングは発行されないからである。長いDNA順序決定(例えば>1 kb)の場合は分析することができる。

【0079】

この本発明の方法変形実施例によりさらに、形状のサイズ(例えば容積、表面)の検出が容易に改善される。これはマルチスペクトル蛍光色素マーカーが逐一に、例えば対象物の表面に分散される場合である。例えばこのようにして数100 nmの半径の均形放熱対象物の容積を、汎用の形態学的セグメント化技術を用いる場合よりも良好に検出できる。これは例えば、CavaleriおよびUvoron法、または容積保存液滴法である。

【0080】

本発明の多次元ウェーブフィールド顕微鏡(タイプIおよび/またはタイプII)と本発明の校正方法によって、別途既知のDNA順序決定を実行することができる。このために本発明では、以下に説明する“DNA順序決定のためのウェーブフィールド顕微鏡法”が提案される。

【0081】

(1) 分析すべきDNAシーケンスのすべての初期サブシーケンスが次のようになに作成される。すなわち、すべてのサブシーケンスが分析すべきシーケンスの同じクレガチャードで開始するように作成される。

【0082】

(2) 分析すべき断片をすべての3'エンドで基準蛍光色素マーカーにより、5'エンドおよび/または所定の中間断片で蛍光色素マーカーa、g、cまたはiによりマーキングする。これはマルチオフセットアデンシン(マークa)、グアニン(マークg)、シトシン(マークc)またはチミン(マークi)をキャリヤーするかに応じて行う。ここで蛍光色素マーカーa、g、c、iおよびnは異なるスペクトル名を有し、それぞれ1つまたは複数の蛍光色素分子を含む。

【0083】

(3) マークされたDNAサブシーケンスを次のようにキャリアに固定する。すなわちこれらが複数シーケンスとして存在し、1次元または多次元ウェーブフィ

ーブフィールド顕微鏡にたらされるよう固定する。

【0084】

(4) 線形DNAサブシーケンスは定位在波面に次のように配向される。すなわち、a、d、e、g、cまたはiとの正確な間隔測定(精度±1*10⁻¹⁰ m)が、強度重心の検出と像特性の校正後に実行できるように配向される。

【0085】

(5) 蛍光色素マーカの倍率をステップごとに、但しにスペクトル分離して記録し、

(6) 蛍光色素マーカの間隔とそのスペクトル番号から、分析すべきDNAハーフのDNAベースシーケンスを抽出する。

【0086】

この従来技術には全く新しい方法により、DNA断片の長さをマルチオフセットで正確に測定することができ、そのベースシーケンスも正確に検出することができる。ゲル電気泳動および後輪のバンド評価を省略することができる。

【0087】

本発明を詳細に説明するための実施例および比較例：

例1：回転可能に支承される対象物を備えたタイプIの多次元ウェーブフィールド顕微鏡の構造
基盤は既存の“一次元ウェーブフィールド顕微鏡”である。この顕微鏡は、開口数の大きな対向する2つの対物レンズを有するか、または干涉する2つのレーザビームに対する対物レンズを有する。対物レンズによりレーザの2つの部分ビームレンズと開口数の大きな対物レンズを有するか、または干涉する2つのレーザビームが次のように干渉される。すなわち、一次元の定位ウェーブフィールドが発生するよう干渉される。開口数の大きい1つまたは2つの対物レンズを介して蛍光が感知される。それでは対物レンズの光軸に対しては2つまたは2つが感知される。この方向で、レーザのそれぞれ2つの別の部分ビームが開口数の小さな対物レンズの方向で、レーザのそれぞれ2つの別の部分ビームが開口数の小さな対物レンズおよび/または焦点レンズ系を介して適切な距離で入力が介され、相互に一次元の定位ウェーブフィールドと干涉される。これにより強度最大値と強度最小値からなる2次元または3次元の対称性強度パターンが発生する。

【0088】 この“多様元”ウェーブフィールド顕微鏡に対象物支承のために微細軸トモグラフが組み込まれる。

【0089】

細トモグラフでは、ガラス対象物支持体の代わりに毛細管またはグラスファイバが使用され、これらは回転可能に支えられ、(生物学的)対象物を収容(毛細管)するか、または(生物学的)対象物が適切に取り付けられる(毛細管/ファイバー)。手動でまたはコンピュータ制御したステップモーターにより、通常は検知対象レンズの光軸に対して垂直に配置された毛細管/ファイバをファイバ軸を中心(=所定の角度だけ回転)することができる。36°・(2π)の角度の回転も可能である。毛細管/ファイバに対する支持体ホルダは半円に回転可能に支承される。ここで回転軸は像が物レンズの光軸に対して直角に存在する。

【0090】

微細シートおよびその周囲の空間的構成の感知は本発明の校正方法とデジタル画像分析を用いて行われる。強度評価の多様性、すなわち蛍光ポイントの強度主最大値と副最大値は適切なコンピュータアルゴリズムを用いて統計的に評価することができる、これにより位置決め精度を向上させることができる。対象物が疊重している場合には、多様性は僅々異なる波長のフォトンによって2またはマハラフォトン疊重することにより低減される。

【0091】

例2: 多様元ウェーブフィールド顕微鏡、本発明の校正方法および場合によりトモグラフを用いて細胞核内の染色体の遺伝子部位の関係を測定する。

【0092】

(1) 離脱法でDNAの染色体クロマチンは所定の部分領域を取る。このようないつまでは複数の染色体部分領域内で、位置決めべき構造体、すなわち測定構造体、例えば母子または祖母子の断片のような小さな染色体部分が、從来技術から公知の蛍光法によって in situで特異的にマークされる。すなわち異なる既知のスペクトル署名M1, M2, M3, …の蛍光色差によりマークされる。マーキング箇所の間隔(マークされた測定構造体の間隔)は古例的了解能以下で

ある。すなわちこの問題は、有効点像分布閾数の主値大底の半值幅よりも小さい

- ・(対象)構造体(測定構造体)のマーキングは、スペクトル署名が位確めわるべき構造体(測定構造体)においてほぼ同じダイナミクスにより代理されるように行われる。

【0093】

生物学的対象物は正確に所定の属性を有するグラスファイバに、または所定の大ささの丸いままたは矩形の毛細管に準備される。

【0094】

(1) 開閉を検出するために、校正ターゲットを備えた頭微鏡プレハートが作製される。すなわち、対象物ないし位置決めすべき対象構造体(=測定構造体)と同じ物理的および化学的環境条件の下で作製される。

【0095】

校正ターゲットとして、ないしは校正ターゲットを備えたプレハートとして例えば

【0096】

a) (単色)スペクトル署名の微細注入された小球を用いる。
小球は、公知の方法に従いそれぞれ1つの蛍光色系により単色マーキングされ、その大きさに基づいて、対象物(測定構造体)やの測定すべき(位確めすべき)構造体から区別することができる。次のような校正小球を注入する。すなわち対象物に存在する測定構造体のスペクトル署名をね、そうでなければ有利には同じ(大きさ、幾何形状、材料特性等)校正小球を注入する。言い替えれば、測定構造体並びに校正ターゲットのスペクトル署名を次のように行われる。すなわち所与の環境条件下で、これらにより校正された蛍光発光が相互に分析できるように選択される。単色校正小球の注入と固定は次のように行われる。すなわち、スペクトル署名の異なる個々の小球がグラスアンド、グラスマイバ表面または毛細管壁に直接並列され、右側にはファイバないし毛細管の横断面に整列されるように行われる。精密ファインおよびノまたは精密毛細管を使用する場合には、小球は相互に所定の間隔で、または基準面、基準軸または基準線から所定の距離に位置する。

【0097】

- b) マルチスペクトル番号 (多色) より同じスペクトルダイナミクスの微細注入可能な液滴小球
- 小球は公知の方針に従い、マーキングされた (対象) 構造体 (測定構造体) において生じるすべてのスペクトル番名によりマーキングされる。その結果、小球は任意の箇所で測定すべき生物学的対象物 (ここでは核) に注することができる。この場合のような日標幾何形状は必要ない。なぜなら、各管径に対して單色重心が同じ箇所で位置決められるべきだからである。マーキングされた (対象) 構造体 (測定構造体) から区別するために、小球は別の大きさ等級に所属するか、または付加的なスペクトル番名を有する。この付加的なスペクトル番名は測定すべき構造体、すなわち測定構造体 (準備プロトコルによる) に限らない。

【0098】

- c) 1つの別の染色体における既知の間隔の同時にマーキングされた染色体領域を位置決めすべき構造体 (測定構造体) を支持するものとして:
- 既知小球、すなわちここでは既知の間隔を有する染色体領域はDNAハシーケンスの進行順次合わせを用いて異なってマーキングされる。このDNAシーケンスは異なるスペクトル番名を有する。染色体校正ターゲットを位置決めすべき (染色体) 構造体 (測定構造体) から区別することは、例えば種々異なる蛍光強度により行うことができる。またはスペクトル番名の異なる蛍光色差間の異なる強度割合により、または測定ターゲットの蛍光マーキングの際に使用されたスペクトル番名とは異なる付加的な蛍光色系を使用することにより行うことができる。

【0099】

- 校正ターゲットが位置決めすべき測定構造体とは別の大きさ等級に所属することもできる。
- (11) 間隔測定は本発明の多色光ウェーブフィールド顕微鏡により、フォトマルチブライヤおよびノーマルおよびデータ処理装置と組み合わせて実行される。生物学的対象物、ここでは例として細胞核から一連の光学的断面が記録される。測定構造体は測定された位置は比較点を基準に検出される。この比較点は例えば対象物内で任意に示された固定の点、または校正ターゲット (例えばマーキング

【0097】

- ル番名を有する。校正ターゲットU1, U2, U3,...,U1のスペクトル番名は測定構造体のスペクトル番名とは、例えば容積、直径、強度またはスペクトル番名の数 ($i = 1, 2, \dots, L+1$) の点で異なる。光学的断面の画像は各スペクトル番名ごとに別個に記録され、場合によりさらにはバックグランド補正される。評価のためにまず、校正ターゲットが同定され、色収差が検出される。このたがいに校正ターゲットが各スペクトル番名の下で位置決めされ、ペクトル番名の異なる蛍光色素マーキングを備えた校正ターゲット間の間隔が測定される。測定された位置 (すなわち測定されたターゲット間隔) は幾何形状に基づき計算された目標位置 (すなわち実際のターゲット間隔) と比較され、これからスペクトルに起因するずれ (シフト) が検出される。

【0101】

- このずれ (シフト) は、位置決めすべき (対象) 構造体 (測定構造体) 間で測定された間隔に対する校正値である。

【0102】

- このずれはプレラートの光学的特性 (例えば核およびフレラート液体における屈折率) に依存するから、構成は *in situ* で行なわれなければならない。すなわちこの実施例では、検査しまーキングすべき (染色体) 構造体 (測定構造体) の傍らで核内に存在しなければならない。

【0103】

- さらに、位置決めすべき (対象) 構造体 (測定構造体) 間の間隔が位置決めされる。ここでは各スペクトル番名でまず、相互に依存しないで、測定された強度の重心位置が検出される。すなわち、個々異なる色は半周の間隔ないしは該当する測定構造体の色点間の間隔、例えば赤発光する色点と緑発光する色点との間の間隔が測定される (最大強度から最大強度まで、または重心から重心まで)

- 。そしてこの測定値が校正ターゲットにより検出された (個々異なるスペクトル番名に起因する) オリジナルだけ高精度度に補正される。

【0104】

- 測定構造体の補正された位置は比較点を基準に検出される。この比較点は例えば対象物内で任意に示された固定の点、または校正ターゲット (例えばマーキング

された染色体領域) の重心、または可らかのノードで示された染色体トリマーの重心とすることができる。しかしそすべての測定構造体の重心距離が染色体トリマー内にあることもできる。

【0105】

校正ターゲットがマルチスペクトル署名(多色)を有する微細人可能な検査小球の形態であれば、色収差は各名に対する重心の位置差から検出される。校正ターゲットに所属する蛍光発光の、そのために必要な同定は例えば、各臓器法または臓器変化の際のセグメント化結果を平均することによって行うことができる。

【0106】

校正ターゲットが、マルチスペクトル署名(多色)を備え、蛍光色素マーキングされた計算領域の形態においては、色収差は正確に検出される。

【0107】

蛍光色素マーキングされた構成領域として動原体領域も適する。この動原体領域は、次のようなDNAハザーケンスの試行組み合わせによりハイブリッド化される。このDNAハザーケンスはすべて同じ染色体DNA部分で結合するが、スペクトル署名の異なる蛍光色素によってマーキングされる。ハイブリッド化が重複した条件の下に行われれば、1細胞当たりに2つのマーキング領域が存在し、条件が選択されれば、付加的な副次結合領域により附加的な動原体領域がマーキングされる。これにより構成領域の数が1に帰する。これは場合により非常に有利である。

【0108】

(IV) 説明した測定方法は熱トモグラフとの組み合ひでし运行することができる。このために生物学的対象物が生物学的対象物、例えば細胞がグラスファイバまたは毛細管に配置される。この細胞接着では位置決めすべき測定構造体がすでに蛍光によりマーキングされており、またすでに校正ターゲットを含んでいる(例1参照)。熱トモグラフにより対象物はステップごとに所定の角度だけ回転され、場合により自動的にリフォーカスされる。各角度ステップから完全な2D画像ステープルまたは3D画像ステープルが記録される。

【0109】

回転は、2つの測定構造体ないし校正ターゲット間のそれぞれの(すなわち蛍光強度重心間) 間隔が最大になるように行われる。測定された最大間隔は実際の間隔に相応する。

【0110】

次に測定構造体ないし校正ターゲット間の間隔に興味があれば、すなわちその空間的绝对配位には興味があれば、既知の測定構造体ないしは校正ターゲットから川免して、算3の校正ターゲットまでの間隔を最大にし、検出することができる。測定構造体ないし校正ターゲット間の間隔が点像分布関数の主最大値の半価幅よりも大きければ、ただ1つのスペクトル署名で十分である。これに対して間隔がそれより小さければ、測定構造体ないし校正ターゲットをマルチスペクトル署名により区別しなければならない。信号の重心(最大値)は位置決めて用いられる。採友される測定構造体が、有効点像分布関数の主最大値の半価幅よりも小さい程度を有していれば、測定構造体ないし校正ターゲットのすべての回折画角は鮮鋭な点像分布関数により検出される。これにより最大値を最適に検出することができる。

【0111】

測定構造体ないし校正ターゲットの空間における绝对的配位に興味があるなら、それぞれの重心を正前に検出しなければならない。全体の測定手続きを複数回繰り返し、統計的に評価することにより、測定構造体ないし校正ターゲットの绝对的位置決め、すなわち所度測定を改善できる。

【0112】

前に説明した校正と、位置決めすべき構造体、すなわち測定構造体間の間隔測定を同じ生物学的対象物で実行する代わりに、校正を測定構造体に行使しないで、同種の生物学的対象物で実行することができる。この方法変形実施例では、校正ターゲットの蛍光信号と、測定構造体の蛍光信号との区別が容易になる。校正ターゲットにより検出された光学的ゲートの基に基づいて、測定構造体間の間隔測定に対する校正曲線を作成することができる。この曲の校正曲線により例えば、使用される構造体、使用される光学系、フィルタおよび検知ユニット、使用さ

れる評価アルゴリズム、使用される生物学的対象物、測定構造体ないし校正ターゲットの位置等の信頼性および堅膜の開放としてのスペクトルオーバーラップを要することができる。この特別な校正曲線からの情報は本明の開闢測定に、とりわけ大きな精度公差が計算される場合に使用される。

【0113】

例4：3次元に地図した対象物を多次元ウェーブファイアード顕微鏡、本発明の校正方法および同時に画像記録によって保存し表示する。

【0114】

通常、生物学的対象物から3D空間が連続的記録によって得られる。例えば黒点レーザまたは顕微鏡では3D対象物群を点ごとに定位するこにより得られる。第2の方法は、対象面からの蛍光放射を検出アレイの位置決めによって記録することである。この検知アレイの位置決めは対象面と共役の中間画像面の位置が固定される。生物学的対象物の3D構造を得るために、対象物は通常的に固定の中間画像面に対して半径の対象面を通過して運動される。そのときに固定の中間画像面によってモトグラフ法によって直角集合が記録される。および/または対象物はモトグラフ法によって直角な回転角度だけ回転され、そのときに固定の中間画像面に対して半径の2D画像データ集合が記録される。

【0115】

対象点、対象ライン、または対象面のこの連続的記録は種々の次点を有する。例えば、3Dデータ集合の記録が複数すれば、所定のスペクトル器名でマーキングされた対象点の蛍光分析において本明により検出された3D重ねがされてしあう。別の次点は、3Dデータ記録が十分に高速ではなく、恒久的には安定しない、すなわち運動する対象物の場合、とりわけ数mm/sまでの速度による物理条件の下で運動する生物細胞の場合において蛍色体領域が蛍光マーキングされるような *In vivo* マーキングの場合には、満足できる画像品質が保証されない。

【0116】

対象物が運動する場合でも満足できる画像品質を得るために、本明では蛍光マーキングされた対象物を3Dデータ集合を同時に記録する。このために対象物が

ら放付された所存のスペクトル器名の蛍光光が光学的要素、例えばハーフミラーによってN個の部分ビームに分割され、N個のデータアレイに供給される。データアレイはN個の異なる中間画像面に存在し、この中間画像面はN個の異なる対象面に対して共役である。結果等式に基づいた商業的な推定により、中間画像面（検知面）の間隔は、 $10 \mu\text{m}$ の輪郭間広がりを有する対象領域と、從来の像距離と開口数の大きい対物レンズとを同時に記録する場合には、 $520 \mu\text{m}$ のオーダーで1倍だけ変化しなければならないことが判明した（使用される対物レンズに依存して）。別のN個の中間光学系により、高精度間隔測定のために、記録すべきN個の対象面に關連する対象領域を、同じ適切な大きさ付近の検知アレイ（ないしはしくNの検知アレイ）の別の領域に結合することができる。この場合、L個の検知アレイの所定の部分にはN個の共役対象面の1つが相当する。例えば数 μm の広がりの小さな対象領域を測定のためにウェーブフィールド顕微鏡にまたがるように粗く位置決めする。すなわち、その重心が所定の（中間）画像面Bに対する検知点間分布閾値により定められた、範囲に使用される顕微鏡対物レンズの視野範囲のほぼ重心に来るよう粗く位置決めする。3D対象物から発する蛍光光をそのスペクトル器名に従って別個にN個の部分ビームに分割する。このN個の部分ビームはN個の検知アレイ（例えばそれぞれ 8×8 、 16×16 または 64×64 のピクセルサイズ）に記録され、これらの位置決めによりN個の共役対象面からの蛍光放射の記録が検知点間分布閾値（画像面Bを基準にして）の最大値を中心に行われる。

【0117】

例えばそれぞれ 20nm の間隔を有する対象物を同時に記録する場合、簡單な推定によれば上記の前述の下で、共役中間画像面をそれぞれ少なくとも $100 \mu\text{m}$ （点像分布閾値の最大値の近傍）だけずらさなければならぬ。または相応の小さな光学的個別補正を、関連する対象部分の同時検知の際に相応するピクセル数のただ1つの検知アレイ（またはしくN）で実行しなければならない。並光放射を例えば同じ強度のN=20の部分ビームに分割する場合には、N=20の検知アレイの各々（または検知アレイ部分）により單位時間当たりに記録されるフォトンの数はまさに同じ値だけ低下する。並光マーキングされた対象物の放

がから品質はこの場合、フォトン統計の悪化により推定で係数「(2.0)」だけ低下する。この火点は、記録時間と係数N（例えばN=2.0）だけ上昇することにより除去できる。この場合、対象物の同時に記録は、連續記録の場合と同じ程度長く持続する。褪色特性を有する対象物の場合、同時に2次元記録の利点は、観察容積のすべてのターゲット（所与のスペクトル群名）に対して類似の褪色特性が存することである。褪色に起因する蛍光放射像の重心のずれがこのことにより緩和されれる。

【0118】

例えばワーファーリード顕微鏡における3D位置決め精度が約±3 nmの場合、画像ごとに1秒の逆記録時間により、同時記録の前記条件の下で位置決め精度が、そのほかは同じ条件下で2.0倍率を同時に記録すると推定で±4.5*3 nm≈1.4 nmに低下する。（例として）仮定した5 nm/s（平均すれば）の対象物運動では、実際の位置決め精度は、2.0倍の全体記録時間による逆記録記録の際に初期劣化を考慮しなくともすでに格段に大きくなる。ここで本発明によれば、前述の対象物の同時記録は1つの光軸についてだけでなく、2つおよび3つの直交する光軸についても行われる。

【0119】

例えばワーファーリード顕微鏡における3D位置決め精度が約±3 nmの場合、画像ごとに1秒の逆記録時間により、同時記録の前記条件の下で位置決め精度が、そのほかは同じ条件下で2.0倍率を同時に記録すると推定で±4.5*3 nm≈1.4 nmに低下する。（例として）仮定した5 nm/s（平均すれば）の対象物運動では、実際の位置決め精度は、2.0倍の全体記録時間による逆記録記録の際に初期劣化を考慮しなくともすでに格段に大きくなる。ここで本発明によれば、前述の対象物の同時記録は1つの光軸についてだけでなく、2つおよび3つの直交する光軸についても行われる。

【0120】

必要な場合には、この本発明の同時記録を間断なしに從来の逆記録像記録と組み合わせることができる。

【0121】

例4：多光元ワーファーリード顕微鏡を使用したDNA分析法

公知の方法、例えばポリメラーゼ逆転反応を用いて、分析すべきDNAシーケンスのすべての相補的サブシーケンスを作製することができる。サブシーケンスはすべて分析すべきシーケンスの同じストレオチドから開始する。分析すべき断

片はすべて3'エンドにおいて基盤性光色素マーカーによりマーキングされる。別のエンド、5'エンドないし所定の中間箇所においては、スペクトル群名の異なる蛍光色素マーカーa、b、c、dによりそれぞれマーキングされる。これは又クレオチドがベース、アデニン（マーカーa）、アシン（マーカーb）、シトシン（マーカーc）またはチミン（マーカーd）をキャリーしているかによる。

【0122】

使用される蛍光色素マーカーのすべての形式はそのスペクトル群名において、これら蛍光色素マーカーa、b、c、d（場合によりさらに多選）は相互に別個に識別することができるように異なる。1つの所定の蛍光色素マークは本発明に上れば、1から多数の同じまたは種々異なる蛍光色素分子により形成される。ここで蛍光色素マーカーの長さおよび組成は、開始部にある蛍光色素マークの強度分布と終端部にある蛍光色素マーク（またはbまたはcまたはdまたは組合により別のベースに対する別の）の強度分布の重心間の間隔測定が多次元シェーブファーリード顕微鏡の方法により可能であるように選択される。すなわち蛍光マークに対するリンク分子は例えば1/2スケレオチド直径よりも小さくなければならぬ。本発明によれば、比較的に長いリンク分子を使用することもできる。これは、リンク分子が剛性の高い構造を有し、これに起因して測定公筋が十分に小さく、例えば<1/2スケレオチド直径である場合である。

【0123】

このようにマーキングされたサブシーケンスは分析すべきDNAハグメンスを完全に挿入。蛍光マーカーa、b、c、dないし基盤性光色素マークはそれぞれ1つまたは複数の蛍光色素分子を含むことがができる。DNAサブシーケンスはすべて適切なキャリアに固定され、このキャリアは線形シーケンスとして存在する。

【0124】

蛍光色素マーキングされたDNA破片はDNAヘコミング技術によって線形に並列される。従来の一級元ウェーブファーリード顕微鏡とは異なり本発明の多光元ウェーブファーリード顕微鏡では、DNA列をシステムの光軸のノット間に附加的に正確に整列することは必要ない。DNAシーケンスは平行には4角形のグラスファイバーに取り付けられる。このグラスファイバーの屈折率は周囲の媒体の屈折

争とはほとんど違わない。ここで所定の角度、とりわけグラスファイバの軸に対して逆さまにする角度での整列が行われる。そしてDNAシーケンスの重心相位の平均間隔は、蛍光標的の凝聚に使用された点像分布閾数の最大平均値よりも大きい。別な方法が、3'エンドをスペクトル等名の簇細小球で結合し、統いてDNA系を光学的ビンセント工具により伸張する。ここでは“ビンセントレーザ”の操作を適切に選択しなければならない。

【0125】

DNAシーケンスを輪形化しない配向した後、このようにして作製されたプレパートが固定され、例えば温度低下による分子運動が低減される。併一的にDNAヘ終端部の固定部に整列された固体構造物がグラスファイバ、DNA糸束等が斜め目的で、別のとりわけ多色微細粒物ががグラスファイバ、DNA糸束等が斜め目的で、またはDNAヘ終端部の固定部に取り付けられる。校正対象物は附加的に、a、l、c、またはbでないスペクトル等名を含む。DNA列の線形化は、すべてのスクレオチドが分析すべきDNヘ相前列の合成の際に適切に蛍光マークシンダされるなら省略することができる。

【0126】

固定されたDNAヘシーケンスは多元元ウェーブファイアード頭微鏡に取り付けられる。このとき輪形化DNAサブシーケンスは定位表面に次のように配向される。すなわち、aとさないしも、cまたはlとの正確な間隔削除（精度±1*10⁻¹⁰m）が強度重心の検出と結像特性の校正の後で可能であるように配向される。

【0127】

測定は、in situ校正の場合、水流の校正方法を適用して行われる。蛍光色素マークの場合は、適切に適合されたステップ幅を有するウェーブフィールド強微鏡において相前列に分離して記録される（有利にはデジタルで）。蛍光マークの間隔とそのスペクトル等名から、分析すべきDNA断片のDNAヘベースシーケンスが検出される。

【0128】

スペクトル分離の代わりにまたはこれに追加して、蛍光基团標示マーカーを準備されたDNA剤はイオン濃度の低いバッファ中の溶液で、特別の被覆され

分析することができる。評価の第1フェーズでは、蛍光色素マーク信号の重心の相除算が行われ、この情報を基礎として、DNAシーケンスに所属する信号が上述のような間隔基準に従い、別のDNAシーケンスに所属する信号が分離される。評価の第2フェーズでは、スペクトル分解されて記録され、変調された蛍光色素マークの信号が適切に適合された閾数によって分析される。ここから、DNAシーケンスの開始部にある蛍光色素マーク信号と終端部にある蛍光色素マーク信号の重心の間隔が分子レベルの精度で検出される。ここで校正対象物で行なわれた測定は間隔信号の補正、例えば色収差の補正に使用される。評価の第3フェーズでは、DNAヘシーケンスの長さに相当する蛍光色素マーク信号の間隔が長さの増大後に、終端部の蛍光色素マーク（例えばa、b、c、l）の形式に従って分離して配列される。このようにして生成された物質は、從来の方法で造成されたパターンに相当する。このパターンから公知の方法に従って所望のシーケンス情報を取り出すことができる。

【0129】

輪形シーケンスないしは既知の配列構造を有する巨大分子の場合も同様に行なう。ここで蛍光色素マークの数と形式は分子構成要素の数と形式に依存する。

【0130】

例々のDNA列の測定が光軸の方向における整列を必要とする場合には、本発明により以下のように実現される。DNAヘ筋の活性化的終端部をスペクトル等名の蛍光マークによりマーキングするのである。DNAヘ筋フレラートの残余部分、とりわけ終端部の蛍光マークa、c、g、lのマーキングは冒頭に述べたように実行される。終端部のベースaおよび/またはストップスクレオチドのマーク、および場合により整列すべきDNAヘクサイの別のベースは適切を有する（例えばa）。

【0131】

DNA鎖の整列は順次複数の前または間にを行うことができ、また開始位置法の前の整列方法が説明される。

【0132】

た対象物支持体（またはカバーガラス、これは以下では対象物支持体と称する）に取り付けられる。対象物支持体は複DNA鎖の化学的にマークされた3'・エンドを結合（接種）することができる。前液は次に不動の状態が添加される。この成分は所定時間後に溶液中のDNA鎖を原化させる。対象物支持体は（被覆されない）カバーガラスにより覆われ、封印される。ここで対象物支持体からカバーガラスまでの間隔は適切な“スペーサー”（例えば薄いグリヤフラン）により十分に定義された直に確保することができる。この静電界は前記されたベースを整列させる、世界（例えばコーンンサ）の極性はここでは、ベースが負に偏極している場合にカソードが設置された対象物支持体（巻きされた3'・エンドを有する）に、アノードが設置されないカバーガラスに来るようになる。ベースが正に偏極している場合はその反対である。電界線は対象物支持体の表面に対して垂直に延びる。電界の強度は、溶液中のDNA鎖が整列されるように十分に大きく選択する。

【0133】
このように整列されたDNA鎖は対象物支持体カバーガラスの中間空間で不動になった後、DNA鎖は多元元ウェーブフィールド顕微鏡により前に説明したように記録され測定される。

【0134】
DNA鎖の屈曲を顕微鏡記録の間に行なうべきなれば、上に述べた世界は本発明により次の方法によって構成される。
【0135】
被覆された対象物支持体は十分な平面性を行なう専用ミラーである。DNA鎖の浴液（小さなイオン濃度）は適切な粘度を有し、不動成分は浴液に添加されない。ここでも（場合により適切なスベーザを使用して）カバーガラスが取り付けられ、封印される。ウェーブフィールドは常にただ1つの対象物レンズによりミラーと開通して形成される。ここで、対象レンズから発せられた励起光はミラーと一緒に反射され、…多元元のウェーブフィールド（焦点面またはミラー裏面に対して平行）を形成する。正（A）の電圧を、負（B）に荷電したベースを使用する場

合に印加すると、DNA鎖がミラーの表面に対して垂直に整列される。すなわち顕微鏡の光軸に沿って整列され、前に説明したように顕微鏡をすることができる。この方法でも電界の強度は、DNA鎖を整列するために十分に大きくなればならない。分子の熱運動は例えば温度低下によって低減することができる。

【0136】

この実施例と同じように仕組の他の剤形巨大分子を取り扱うことができる。

【0137】

例5：側方空間に空調された蛍光励起による多元元ウェーブフィールド顕微鏡
例5：側方空間に空調された蛍光励起タイプ1-1は空間方向xにコヒーレントな光
多元元ウェーブフィールド顕微鏡タイプ1-1は空間方向xにコヒーレントな光
ビームに対するアルゴン光源を有し、さらに部分ビームを出力結合するためのビ
ームスプリッタを依次組み立てて作る。第1の対物レンズはこれら2つの照
明部に配属されている。この第1の対物レンズに照光部の光ビームないし光波シ
ーケンスが次のように入り結合される。すなわち光ビームないし光波シーケンス
が、対象空間とは反対側の後方焦点面（この面は“裏焦点面”と称される）に、
相互に距離をおいた2つの焦点を形成し、2つの焦点面間の間の空間で所定の角
度で相互に延在し、一次元の定在ウェーブフィールドと干涉するように入力結合
される。

【0138】

光ビーム（光波シーケンス）を光軸に対して適切な角度でこの焦点面にフォー
カシングすれば、（光軸は焦点面に対して垂直であり、その中心を通って延在す
る）対象空間では平坦な波面を有する平行光束が対物レンズを、光軸に対して所
定の角度で通過する。この角度は可変調整することができ、光軸に対してどの程
度の角度で通過するか、および対物レンズの形式
に依存して調整される。

【0139】

第2の光ビーム（光波シーケンス）をこのような外側の下で第1の対物レンズ
に入力結合すれば、その焦点は裏焦点面で第1の光ビームの焦点に対して直線の
反対側に来る。すなわち、焦点1-光軸-焦点2となり後方焦点面にラインが形

成される。そして2つの出点面の間の空間に、半透明な板面を備えた第2の平行光束が発生する。この光束は所定の角度で第1の光束に対して延び、これと共に対象空間で、最大光強度の値を有する…次元定位ウェーブフィールドと干渉する。

[0140]

第1の対物レンズには第2の対物レンズが開端を有いて、鏡像的に対向して配置されている。これによりこれら2つの対物レンズは3次元対象空間の2つの対向する間に来る。この第2の対物レンズには、コヒーレントな光ビームに対する第3と第4（リアルまたはバーチャル）の照明顔がどのように配賦されている。ナチュラル、2つの照明源の光ビームが、第1の対物レンズに対して鏡像したのと同じように、後方の、対象空間とは反対側のこの第2の対物レンズの焦点面にフォーカシングできることにより、この第2の対物レンズの2つの焦点面の間に、…次元定位ウェーブフィールドと干涉することができる。そして対象空間では第1の対物レンズの一次元定位ウェーブフィールドと干涉することができ、これにより3次元ウェーブフィールドが発生し、このウェーブフィールドは3次元空間に通過する最大強度の点を有している。

[0141]

2次元ウェーブフィールドを形成するために（けなむち1つの面での最大強度の点）、前記の構成が次のように変更される。すなむち、第1および第2の対物レンズを使用するが、そのうちの一方を照明顔と結合する。

[0142]

またはただ1つの対物レンズだけを使用し、これを第3の照明顔と結合する。第3の照明顔のコヒーレントな光ビームを他の2つの照明顔の光ビームに、このただ1つの対物レンズで入力結合する。これにより結合する3つの焦点が焦点面に二等辺三角形を形成し、その中心に光軸が延びる。対象空間では3つすべての光ビームが別個の対物レンズを光源に対して同じ角度で通過するが、それぞれ方向が異なる。

[0143]

ただ1つの対物レンズを使用する、多次元ウェーブフィールド頭盤を形成す

るための本発明によるウェーブフィールド頭盤タイプ1の変形実施例は、3次元ウェーブフィールドを形成するのに最も使用できる。このために4つの光ビームを同じ対物レンズに偏向する。これはこれに相当する4つの焦点が焦点面で等辺の四角形を形成するようを行う。

(44)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Category		Classification	Relevant information, including, where applicable, name, specification, or the source of the prior art	Priority date claim file
A	HD 06 31522 A (NEW YORK UNIVERSITY)	10 October 1996	see page 4, 1st paragraph see page 12, line 18 - line 20 see page 57, line 13 - line 15 see page 70, line 18 - line 26 see page 71, line 12 - page 72, line 33 see page 92, paragraph 1 see page 100, line 1 - line 3	10, 11
A	6 BALLEY ET AL: "Optical subsectioning and multiple focal plane imaging in the standing-wave fluorescence microscope" PROCEEDINGS, 32nd ANNUAL MEETING OF THE MICROSCOPY SOCIETY OF AMERICA, New Orleans, US, 31 July - 5 August 1994, pages 158-159 XPO02685004 see page 159, line 15 - line 17	8 August 1996	see page 3, line 14 - page 4, line 11 see page 6, line 26 - page 7, line 6 see figures 1, line 6 - page 17, line 27; figures 2-6	11
A	MO 96 24082 A (UNIVERSITY OF CALIFORNIA)	8 August 1996	see page 3, line 14 - page 4, line 11 see page 6, line 26 - page 7, line 6 see figures 1, line 6 - page 17, line 27;	1
A	W DEER ET AL: "Therapeutic laser scanning fluorescence microscopy"	SCIENCE, vol. 248, no. 4951, 6 April 1990, pages 73-76, XPO00268741 Washington DC	cited in the application	8
A	Y KRISHNAMURTHI ET AL: "Image processing in 3D standing-wave fluorescence microscopy"	PROCEEDINGS SPIE - THE INTERNATIONAL SOCIETY FOR OPTICAL ENGINEERING, vol. 2655, - 1996 pages 18-25, XPO02685003	cited in the application	-----

ପ୍ରକାଶକ ପତ୍ର ମହିନେ ପରିଚୟ

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		Information on patent family members		Information on application No. PC1 / Ut 98/11908	
Priority date	Priority date	Patent family members	Patent family members	Publication date	Publication date
WO 9416594 A EP 0732584 A	18-08-1994 18-09-1996	US 5390253 A AU 031173 B 6169934 A CA 2155521 A EP 0682730 A JP 8509817 T US 5801891 A	5624885 A 5609743 A 5607568 A US 5335889 A JP 8256755 A	28-02-1995 14-03-1998 29-08-1994 18-08-1994 22-11-1995 15-10-1996 01-09-1998	29-04-1997 11-03-1997 04-03-1997 23-07-1996 08-10-1996
WO 96151522 A	10-10-1996	US 5720920 A AU 5532136 A EP 0871640 A	5671085 A 4773896 A CA 2219911 A EP 0807273 A	24-02-1998 23-10-1996 21-10-1998	23-09-1997 21-08-1996 08-09-1996 19-11-1997
US 4621911 A	11-11-1986	None			